

Avaliação *in vitro* dos lipopeptídeos produzidos por *Paenibacillus elgii* na inibição de *Klebsiella pneumoniae* Multirresistente e outras bactérias patógenas.

Débora Luíza Albano Fulgêncio^{1*}, Rosiane Andrade da Costa², Cristine Chaves Barreto³

1. Estudante de IC da Escola de Medicina da UCB

2. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UCB

3. Pesquisadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia/Orientadora

Resumo:

Experimentos prévios, realizados na Universidade Católica de Brasília, resultaram no isolamento e caracterização de bactérias produtoras de biomoléculas com potencial biotecnológico. Dentre elas, está o *Paenibacillus elgii* que é capaz de inibir o crescimento de fungos e bactérias. A atividade antimicrobiana de *Paenibacillus elgii* isolada do Cerrado está correlacionada com a presença de lipopeptídeos da família pelgipeptina.

Embora os estudos sobre esses lipopeptídeos antimicrobianos tenham revelado a aplicação no campo veterinário, ainda não foi avaliado um potencial para a saúde humana. Em trabalho anterior, observou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* das pelgipeptinas contra algumas bactérias patogênicas. No entanto, ainda não foi avaliado o seu efeito em bactérias multirresistentes. Este trabalho visa avaliar a atividade antimicrobiana das pelgipeptinas na inibição do crescimento de bactérias patógenas, como a *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Palavras-chave: Paenibacillus, Lipopeptídeos Antimicrobianos, Bactérias Multirresistentes

Apoio financeiro: CNPq

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UCB

Introdução:

A exploração dos micro-organismos como fonte de compostos biologicamente ativos levou à descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana. Com essa, deu-se início à exploração dos micro-organismos como fonte de compostos biologicamente ativos, com uma grande ênfase, ainda vigente, na descoberta de novas substâncias com atividade antimicrobiana. A busca constante por novos antimicrobianos, estimulada pelo aumento do número de micro-

organismos patogênicos resistentes a antibióticos impulsionou pesquisas que possuem como alvo os peptídeos antimicrobianos (AMPs). Eles apresentam rápida e eficiente atividade contra diversos patógenos, possuindo boa estabilidade e baixa toxicidade, além de ser difícil dos patógenos adquirirem resistência aos AMPs. Os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, particularmente, têm-se mostrado mais potentes do que os produzidos por eucariotos, uma vez que são ativos em pequenas concentrações.

Nessa classe encontram-se os lipopeptídeos antimicrobianos, que são pequenas moléculas de cadeias curtas ou cíclicas associadas com uma cauda lipídica ou com uma molécula lipofílica. Eles são capazes de modificar a superfície bacteriana alterando sua hidrofobicidade e também, sua permeabilidade, reduzindo, assim, a contaminação microbiana, a formação de biofilmes; podendo causar a morte bacteriana.

Nesse grupo estão os lipopeptídeos produzidos pela bactéria *Paenibacillus elgii*, isolada do Cerrado, que pertencem à família das pelgipeptinas. Esses compostos foram identificados como lipopeptídeos cíclicos com massas atômicas que variam de 1072 e 1100 Da. Ainda é preciso investigar se cada um desses peptídeos tem efeito antimicrobiano individualmente, e se, a combinação dos mesmos tem efeito sinérgico.

Tendo em vista que diversas bactérias como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Escherichia coli* que são bacilos gram-negativos, e se encontram em diversas fontes ambientais, e quando no organismo de pessoas imunocomprometidas encontram um ambiente propício para o crescimento, levando aos quadros de infecção. E essas bactérias ao apresentar resistência a antimicrobianos, tornam-se sérios problemas de saúde pública.

Assim, o trabalho foi iniciado com o

intuito de explorar o potencial antimicrobiano dos lipopeptídeos produzidos por *Paenibacillus elgii*, e observar o efeito sinérgico desses lipopeptídeos, como uma futura opção para o tratamento dessas infecções e redução da resistência antimicrobiana dessas bactérias.

Metodologia:

A cepa utilizada para produção dos lipopeptídeos antimicrobianos foi *Paenibacillus elgii*, isolada de solo do cerrado. A cultura foi realizada em meio de cultura líquido "Caldo Nutriente" a 37°C por 40 horas.

As bactérias patogênicas selecionadas para esse estudo foram: *Escherichia coli* ATCC11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Klebsiella pneumoniae* (multirresistente – Cepa 3259271 - LACEN). Essas bactérias estão disponíveis na coleção de microorganismos localizada no programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, que possui um laboratório com nível de segurança 2 apropriado para a manipulação desses microrganismos.

A cultura bacteriana de *Paenibacillus elgii* teve as células removidas do sobrenadante por centrifugação seguida de filtração. Em seguida foi realizada uma extração orgânica com butanol na proporção de 1:1. A fase orgânica foi coletada e a fase aquosa descartada. O solvente orgânico foi então evaporado em liofilizador e o precipitado contendo o material intracelular foi ressuspenso em água deionizada.

A fração lipoprotéica obtida do extrato celular foi então submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um cromatógrafo analítico da marca Shimadzu, utilizando uma coluna de fase reversa (Shimadzu C18). Como fase móvel, foram utilizadas água deionizada e acetonitrila acidificadas a 0,1% de ácido trifluor-acético (TFA). A corrida cromatográfica foi realizada nas seguintes condições: 0-65 min variando a concentração de acetonitrila de 5%-95%. O perfil cromatográfico foi monitorado por um detector de UV nos comprimentos de onda de 216 e 280 nm. E os picos cromatográficos foram coletados individualmente, aproximadamente numa porcentagem de 40% de acetonitrila, em que os lipopeptídeos começam a se desprender da coluna.

Depois, foram analisados por espectrometria de massa, utilizando-se o

aparelho MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Os espectros de massa foram adquiridos em equipamento Microflex (Bruker Daltonics) em modo refletido positivo com faixa de massa de 700 a 3500 (m/z). A quantificação dos peptídeos antimicrobianos foi realizada pelo Método de Murphy, que se baseia na correlação existente entre a concentração de uma proteína em solução e sua medida de absorvância nos comprimentos de onda 205, 215, 225nm.

A concentração inibitória mínima (CIM) das pelgipeptinas foi determinada utilizando o método de microdiluição em caldo, de acordo com M7-A6 do "National Committee for Clinical Laboratory Standards", em placa de 96 poços. As placas foram incubadas no leitor Eon Microplate Spectrophotometer, a 37°C sob agitação constante e as leituras foram realizadas a cada 20 minutos a 660 nm. Como controle, foi determinado a CIM dos antimicrobianos cloranfenicol e penicilina.

Resultados e Discussão:

Foram purificados os lipopeptídeos produzidos pelo *Paenibacillus elgii*, conhecidos como pelgipeptinas A, C e B, que correspondem às massas moleculares de 1073, 1087 e 1101. Contra a *E. coli* e *S. aureus*, as pelgipeptinas B e C apresentaram CIM de 32 µg/mL, a pelgipeptina A não inibiu o crescimento dessas bactérias, não sendo mais avaliada no presente estudo. No teste contra a *K. pneumoniae*, as pelgipeptinas B e C foram capazes de inibir seu crescimento, apresentando CIM de 64 µg/mL. O cloranfenicol apresentou um CIM de 16 µg/mL e a penicilina de 0,5 µg/mL, sendo antimicrobianos com potencial igual ou melhores que as pelgipeptinas.

Contra a *K. pneumoniae* multirresistente a carbapenêmicos, observou-se um CIM de 16 µg/mL para a Pelgipeptina C e de 32 µg/mL para a Pelgipeptina B. Por outro lado, a bactéria KPC apresentou CIM de 32 µg/mL para cloranfenicol e para penicilina não foi possível determinar pois, essa bactéria foi resistente à mais alta concentração testada: 1024 µg/mL.

Também foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato lipoprotéico presente no sobrenadante de *P. elgii* na inibição do crescimento de *E. coli*, em que observou-se um CIM superior ao apresentado por cada pelgipeptina isolada. O valor apresentado foi de 7,1 µg/mL, em uma diluição de 1/24 do

extrato lipoproteico (Pelgipeptinas A+B+C). Com esses resultados, pode-se concluir que há um aumento do poder inibitório das Pelgipeptinas quando combinadas, gerando o interesse de avaliar se há de fato efeito sinérgico entre elas quando purificadas, não somente contra *E. coli*, mas também contra as outras bactérias patogênicas já estudadas.

Conclusões:

Com esses resultados pode-se observar o potencial antimicrobiano desses lipopeptídeos, principalmente contra bactérias multirresistentes como a *Klebsiella pneumoniae* multirresistente a carbapenêmicos (KPC). Os resultados mostraram que as pegipetinas B e C apresentam um bom potencial de inibição do crescimento dessa bactéria, *in vitro*. No entanto, o efeito foi similar ao observado com antibióticos conhecidos, quando a bactéria não é multirresistente. Assim, a próxima etapa desse trabalho será avaliar se há o efeito sinérgico entre esses lipopeptídeos, e também com outros antimicrobianos.

Referências bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Nota Técnica nº 1/2013 – Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Brasília (DF): **ANVISA**; 2013.

DENG, Y.; LU, Z.; LU, F.; ZHANG, C.; WANG, Y.; ZHAO, H.; BIE, X. Identification of LI-F type antibiotics and di-n-butyl phthalate produced by *Paenibacillus polymyxa*. **Journal of microbiological methods**. 85: 175-82. 2011.

FIMLAND, G.; JOHNSEN, L.; DALHUS, B.; NISSEN-MEYER, J. Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. **Journal of Peptide Science**. 11. 2005.

KUROKAWA, A. S. **Exploração bioecnológica de microrganismos do solo de Cerrado através da construção de bibliotecas metagenômicas e técnicas de cultivo**. 2006. 249p. (Dissertação de Mestrado). Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília - UCB, Brasília.

LAVERTY, G.; MCLAUGHLIN, M.; SHAW, C.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Antimicrobial activity of short, synthetic cationic

lipopeptides. **Chemical biology & drug design**. 75: 563-9. 2010.

PIRRI, G.; GIULIANI, A.; NICOLETTO, S. F.; PIZZUTO, L.; RINALDI, A. C. Lipopeptides as anti-infectives: a practical perspective. **Central European Journal of Biology**. 4: 258-273. 2009.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**. 31, 1807-1813. 2008

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**. 415, 389-395. 2002

WU, X. C.; SHEN, X. B.; DING, R.; QIAN, C. D.; FANG, H. H.; LI, O. Isolation and partial characterization of antibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69. **FEMS microbiology letters**. 310: 32-8. 2010.